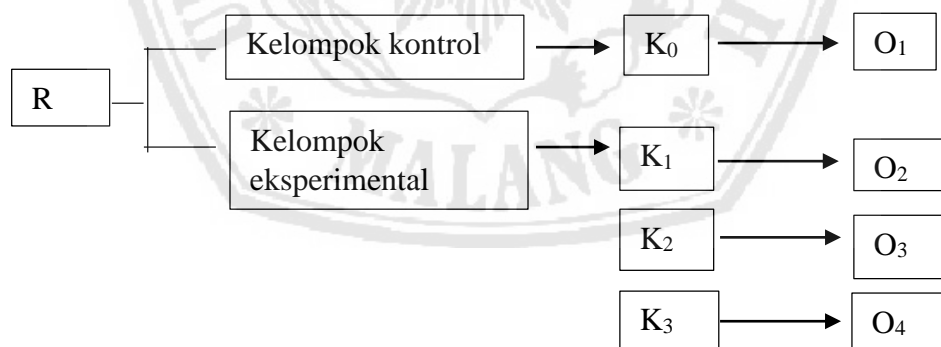


BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Pendekatan dan Jenis Penelitian

Pendekatan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah pendekatan kuantitatif. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen, karena penelitian ini digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dengan kondisi yang terkendali. Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental sesungguhnya (*true eksperimental*). Ciri khas dari penelitian ini yaitu menggunakan kelompok kontrol sebagai pembandingan dengan kelompok yang diberi perlakuan. Penelitian ini menggunakan design penelitian *Posttest Only Control Group Design*. Pengukuran dilakukan setelah perlakuan pada penelitian. Skema penelitiannya adalah sebagai berikut:



Gambar 3.1. Skema Rancangan Penelitian

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Biomedik untuk analisa jumlah koloni bakteri dan Laboratorium Kimia untuk pembuatan kitosan dan analisa kadar air. Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan mei 2018.

3.3 Populasi, Teknik Sampling dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu fillet daging ayam yang didapat dari Rumah Potong Ayam (RPA) di Desa Mulyoagung Kecamatan Dau Kabupaten Malang.

3.3.2 Teknik Sampling

Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *simple random sampling*. Menurut Sugiyono (2015) dikatakan *simple* yang berarti sederhana, sehingga pengambilan anggota sampel dari populasi dilakukan secara acak tanpa memperhatikan tingkatan dalam populasi tersebut.

Besar sampel dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus. Hasilnya didapatkan jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 unit penelitian. Satu kontrol sampel dan tiga sampel fillet daging ayam yang diberi perlakuan konsentrasi kitosan dengan enam kali ulangan.

Perhitungan cara menentukan jumlah ulangan adalah sebagai berikut:

$$(t-1) (r-1) \geq 15$$

$$(4-1) (r-1) \geq 15$$

$$4r-4-r+1 \geq 15$$

Keterangan:

r = replikasi

t = treatment (perlakuan)

$$3r-3 \geq 15$$

n= jumlah sampel (perlakuan)

$$r \geq 18/3$$

$$r \geq 6$$

$$n = t . r$$

$$= 4 . 6$$

$$= 24 \text{ sampel}$$

3.3.3 Sampel

Sampel merupakan bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu fillet daging ayam sebanyak 24 sampel. Fillet daging ayam yang digunakan ukurannya distandarisasikan sebesar 2 cm x 2 cm.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Jenis Variabel

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu konsentasi kitosan cangkang udang vaname (*Litopaneaus vannamei*).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu jumlah koloni bakteri (*Total Plate Count*) dan kadar air pada fillet daging ayam broiler.

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah lama perendaman fillet daging ayam selama 3 menit dan penyimpanan dalam suhu ruang selama 6 jam.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Kitosan pada penelitian ini didapatkan dari ekstraksi cangkang udang vaname dengan tiga tahapan yaitu demineralisasi, deproteinasi, dan deasetilasi.
2. Konsentrasi merupakan angka banding volume zat terlarut terdapat volume zat pelarut. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0%, 1%, 1,5%, 2% berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Wahyuni, Khaeruni, & Hartini, 2014).
3. Angka Lempeng Total adalah uji yang menggunakan media padat dengan hasil akhir berupa pengamatan koloni yang dapat dilihat berupa angka dalam koloni (cfu) per ml/g (Purlianto, 2015). Penelitian ini menggunakan metode hitung cawan dan dihitung dengan menggunakan alat *colony counter*.
4. Kadar air merupakan air yang terkandung dalam bahan pangan baik dalam keadaan basah maupun dalam keadaan kering. Penelitian ini menggunakan metode oven dan dihitung dengan mencari selisih berat sampel dan cawan sebelum dikeringkan dan sesudah dikeringkan.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Penelitian

Tahapan yang perlu dilakukan adalah mempersiapkan alat dan bahan. Adapun alat dan bahan yang perlu dipersiapkan adalah sebagai berikut:

3.5.1.1 Alat dan Bahan Pembuatan Kitosan Cangkang Udang Vaname

Alat

1. Blender	1 buah
2. Beaker glass 500ml	1 buah
3. Beaker glass 250ml	1 buah
4. Beaker glass 100ml	1 buah
5. Timbangan analitik	1 buah
6. Oven	1 buah
7. Ayakan 100 mesh	1 buah
8. Pipet tetes	10 buah
9. Nampan	1 buah
10. Kain saring	0,5 m
11. pH meter	1 buah
12. <i>Magnetik stirrer</i>	1 buah
13. Gelas ukur	1 buah
14. Kompor listrik	1 buah

Bahan

1. Serbuk Cangkang Udang (kering)	50 gram
2. NaOH 3,5%	20 ml
3. Aquades	1000 ml
4. HCL 1 N	62 ml
5. NaOH 50%	250 ml

6. Asam Asetat 1%	100 ml
-------------------	--------

3.5.1.2 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Fillet Daging Ayam Broiler

Alat

1. Pisau	1 buah
2. Penggaris	1 buah

Bahan

1. Fillet daging ayam	1000 gram
2. Plastik wrap	1 buah

3.5.1.3 Alat dan Bahan untuk TPC (*total plate count*)

Alat

1. Cawan Petri	24 buah
2. Spidol	2 buah
3. Sduit (suntikan)	250 buah
4. LAF	1 buah
5. Autoclave	1 buah
6. Inkubator	1 buah
7. Timbangan analitik	1 buah
8. Colony counter	1 buah
9. Bunsen	1 buah
10. Kompor	1 buah
11. Beaker glass 600 ml	5 buah
12. Gelar ukur 100 ml	2 buah
13. Erlenmeyer 50 ml	3 buah

14. Rak tabung reaksi	10 buah
15. Magnetik stirer	1 buah
16. Tabung Reaksi	150 buah
17. Batang pengaduk	1 buah

Bahan

1. Aquadest steril	500 ml
2. Alkohol 70%	50 ml
3. Karet Gelang	250 buah
4. Alumunium foil	1 pack
5. Plastik wrap	1 pack
6. Kertas label	1 lembar
7. Media PCA	7,2 gram
8. Tisu	2 gulung

3.5.1.4 Alat dan Bahan untuk Analisa Kadar Air

Alat

1. Oven	1 buah
2. Cawan porselin	24 buah
3. Desikator	1 buah
4. Timbangan	1 buah

Bahan

1. Fillet daging ayam	1000 gram
-----------------------	-----------

3.5.2 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri atas 4 sampel dengan 6 kali pengulangan. Adapun perlakuan yang diberikan sebagai berikut:

Konsentrasi larutan kitosan (%):

K_0 = Konsentrasi Kitosan 0% (kontrol)

K_1 = konsentrasi kitosan 1%

K_2 = konsentrasi kitosan 1,5%

K_3 = konsentrasi kitosan 2%

Banyak ulangan:

U_I = ulangan 1

U_{II} = ulangan 2

U_{III} = ulangan 3

U_{IV} = ulangan 4

U_V = ulangan 5

U_{VI} = ulangan 6

K_1U_{II}	K_0U_{III}	K_2U_I	K_2U_{IV}
K_3U_I	K_1U_V	K_0U_{VI}	K_0U_{II}
K_2U_{II}	K_3U_{IV}	K_1U_{III}	K_2U_V
K_0U_I	K_1U_I	K_3U_{II}	K_3U_{III}
K_2U_{VI}	K_3U_V	K_1U_{IV}	K_0U_{IV}
K_3U_{VI}	K_2U_{III}	K_0U_V	K_1U_{VI}

Gambar 3.2 Denah Rancangan Acak Lengkap

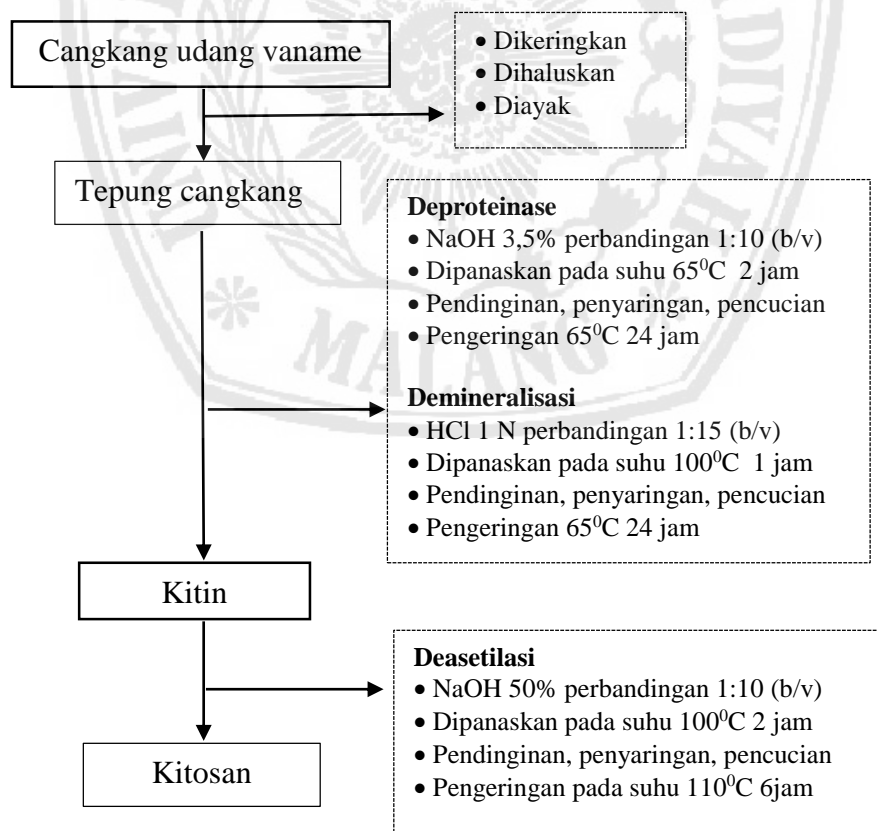
3.5.3 Pelaksanaan dan Alur Penelitian

3.5.3.1 Pelaksanaan Penelitian

Langkah-langkah pelaksanaan penelitian kitosan cangkang udang vaname sebagai antimikroba alami pada fillet daging ayam broiler terdiri dari beberapa tahapan antara lain yaitu:

1. Pembuatan Kitosan Cangkang Udang Vaname

Pada pembuatan kitosan cangkang udang vaname diawali dengan mengumpulkan cangkang udang vaname yang berasal dari limbah PT. Bumi Menara Internusa yang beralamat di Jalan Pahlawan Nomer 1-3 Kecamatan Dampit Kabupaten Malang. Pembuatan kitosan ini dengan menggunakan metode ekstraksi yang dapat dilihat pada gambar 3.3



Gambar 3.3 Bagan Pembuatan Kitosan

Tahapan pembuatan kitosan dengan metode ekstraksi antara lain sebagai berikut:

- a. Proses pembuatan kitosan diawali dengan mencuci bersih cangkang udang vaname menggunakan air yang mengalir untuk menghilangkan kotoran yang melekat, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari selama 2 hari atau dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 80°C selama 24 jam. Setelah kering, cangkang udang di haluskan dan diayak menggunakan ayakan 100 mesh. Hasil ayakan (bubuk cangkang udang vaname) diproses melalui beberapa tahapan yaitu deproteinase, demineralisasi, dan deasetilasi.
- b. Deproteinase dilakukan untuk menghilangkan protein dengan cara menambahkan NaOH konsentrasi 3,5% dengan perbandingan 1:10 (b/v) pada cangkang udang vaname yang telah dihaluskan, setelah itu dipanaskan dengan kompor listrik pada suhu 65°C sambil mengaduk dengan *magnetic stirer* selama 2 jam. Kemudian mendinginkan agar mudah dilakukan penyaringan sehingga didapatkan suatu padatan, setelah itu dilakukan pencucian dan dikeringkan pada suhu 65°C selama 24 jam.
- c. Demineralisasi dilakukan untuk menghilangkan mineral dengan cara mencampurkan bubuk cangkang udang vaname dengan HCl 1 N dengan perbandingan 1:15 (b/v), setelah itu dipanaskan menggunakan kompor listrik dan mengaduknya dengan *magnetic stirer* pada suhu 100°C selama 1 jam. Larutan yang terbentuk kemudian didinginkan agar mudah dilakukan penyaringan sehingga didapatkan padatan. Padatan dicuci dengan air sampai pH netral, kemudian dikeringkan pada suhu 65°C selama 24 jam.

d. Deasetilasi dilakukan untuk menghilangkan gugus asetil dengan cara menambahkan NaOH konsentrasi 50% dengan perbandingan 1:10 (b/v) kemudian memanaskannya menggunakan kompor listrik pada suhu 100⁰C sambil mengaduknya dengan *magnetic stirer* selama 1 jam. Larutan yang terbentuk kemudian didinginkan untuk memudahkan dilakukan penyaringan. Penyaringan dilakukan menggunakan kertas saring Whatman Nomer 42, setelah itu dilakukan pencucian hingga diperoleh pH netral. Setelah itu dilakukan pengeringan pada suhu 110⁰C selama 6 jam dan dilakukan penggerusan sampai didapatkan bubuk kitosan.

2. Pembuatan Konsentrasi Kitosan Cangkang Udang Vaname

a. Perhitungan Konsentrasi Kitosan Cangkang Udang Vaname

Pembuatan konsentrasi kitosan cangkang udang vaname dilakukan dengan cara perhitungan sebagai berikut:

$$1) \text{ Konsentrasi } 1\% = \frac{1}{100} \times 30 = 0,3 \text{ gram}$$

$$2) \text{ Konsentrasi } 1,5\% = \frac{1,5}{100} \times 30 = 0,45 \text{ gram}$$

$$3) \text{ Konsentrasi } 2\% = \frac{2}{100} \times 30 = 0,6 \text{ gram}$$

b. Pelarutan Kitosan Menggunakan Asam Asetat

Konsentrasi kitosan yang telah didapatkan dari perhitungan diatas dilarutkan dengan menggunakan asam asetat 1%.

$$1) \text{ Konsentrasi } 1\% = 0,3 \text{ gram kitosan} + 30 \text{ ml asam asetat } 1\%$$

$$2) \text{ Konsentrasi } 1,5\% = 0,45 \text{ gram kitosan} + 30 \text{ ml asam asetat } 1\%$$

$$3) \text{ Konsentrasi } 2\% = 0,6 \text{ gram kitosan} + 30 \text{ ml asam asetat } 1\%$$

3. Pembuatan Fillet Daging Ayam Broiler

a. Tahap persiapan

Tahap persiapan diawali dengan membeli fillet daging ayam sebanyak 1000 gram di Rumah Potong Ayam (RPA) di Desa Mulyoagung Kecamatan Dau Kabupaten Malang. Fillet daging ayam di generalisasikan ukurannya menjadi 2cmx2cm sebanyak 24 potong fillet daging ayam untuk 4 perlakuan. Setiap perlakuan menggunakan 6 potong fillet daging ayam.

b. Tahap perendaman

Fillet daging ayam untuk setiap perlakuan direndam menggunakan larutan kitosan selama 3 menit, kecuali untuk fillet daging ayam tanpa perlakuan konsentrasi perendaman. Menurut Anggraeni (2012) perendaman 3 menit merupakan waktu yang optimal karena tidak merusak penampakan, tekstur, dan bau. Setiap fillet daging ayam yang sudah direndam ditiriskan dan disimpan.

c. Tahap penyimpanan

Fillet daging ayam yang sudah direndam dan ditiriskan, kemudian disimpan dalam mika pada suhu ruang selama 6 jam dengan keadaan terbuka.

4. Analisa Kandungan Total Bakteri dengan menggunakan TPC (*Total Plate Count*) Metode Hitungan Cawan

a. Perhitungan Pembuatan Plate Count Agar

$$\begin{aligned}
 \text{Gram PCA} &= \frac{\text{jumlah cawan petri} \times 15 \text{ ml} \times \text{standart}}{100} \\
 &= \frac{24 \text{ cawan} \times 15 \text{ ml} \times 20}{100} \\
 &= 7,2 \text{ gram}
 \end{aligned}$$

b. Tahapan Pengenceran

Pengenceran dilakukan pada tingkat pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-6} .

Tahapannya antara lain sebagai berikut:

- 1) Sampel fillet daging ayam ditumbuk kemudian ditimbang sebesar 1 gram, menambahkan aquadest steril 9 ml dan diaduk hingga homogen, sehingga dihasilkan suatu suspensi yang berupa ekstrak fillet daging ayam. Pada tahapan ini diperoleh suspensi dengan pengenceran 10^{-1} .
- 2) Pengenceran 10^{-2} dilakukan di dalam *Lamina Air Flow* yaitu dengan cara mengambil suspensi dari tingkat pengenceran 10^{-1} sebanyak 1 ml dengan sped, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi 9 ml aquadest steril, kocok agar suspensi tersebut menjadi homogen.
- 3) Selanjutnya dilakukan prosedur yang sama untuk pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-6} untuk selanjutnya perhitungan jumlah koloni bakteri.

c. Tahapan Inokulasi dan Inkubasi

- 1) Mengencerkan 3 tabung PCA dalam air yang mendidih.
- 2) Medinginkan agar selama 5 sampai 10 menit dan menuangkan ke dalam cawan petri serta dibiarkan agar membeku.
- 3) Mengambil 0,1 ml dari setiap suspensi hasil pengenceran dengan sped yang berbeda.
- 4) Meratakan suspensi di atas permukaan lempengan agar menggunakan alat penyebar.
- 5) Membalik cawan petri dan media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

6) Menghitung koloni dengan menggunakan colony counter.

7) Menentukan jumlah koloni dengan metode SPC.

5. Analisa Kandungan Kadar Air

Pengukuran kadar air dilakukan dengan menggunakan metode oven. Kadar air sampel ditentukan pada berat sebelum dan sesudah dikeringkan. Cawan kosong dikeringkan menggunakan oven selama 5 jam atau sampai berat konstan pada suhu 105⁰C. Langkah selanjutnya cawan didinginkan menggunakan desikator selama 30 menit, lalu cawan ditimbang. Sampel sebanyak 2 gram ditimbang dan diletakkan kedalam cawan. Langkah selanjutnya cawan yang berisi sampel dipanaskan menggunakan oven pada suhu 105⁰C-110⁰C selama 3-4 jam dan kemudian cawan didinginkan didalam desikator selama 30 menit dan selanjutnya ditimbang kembali. Perhitungan kadar air dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$Kadar\ air\ (\%) = \frac{B1 - B2}{B} \times 100 \%$$

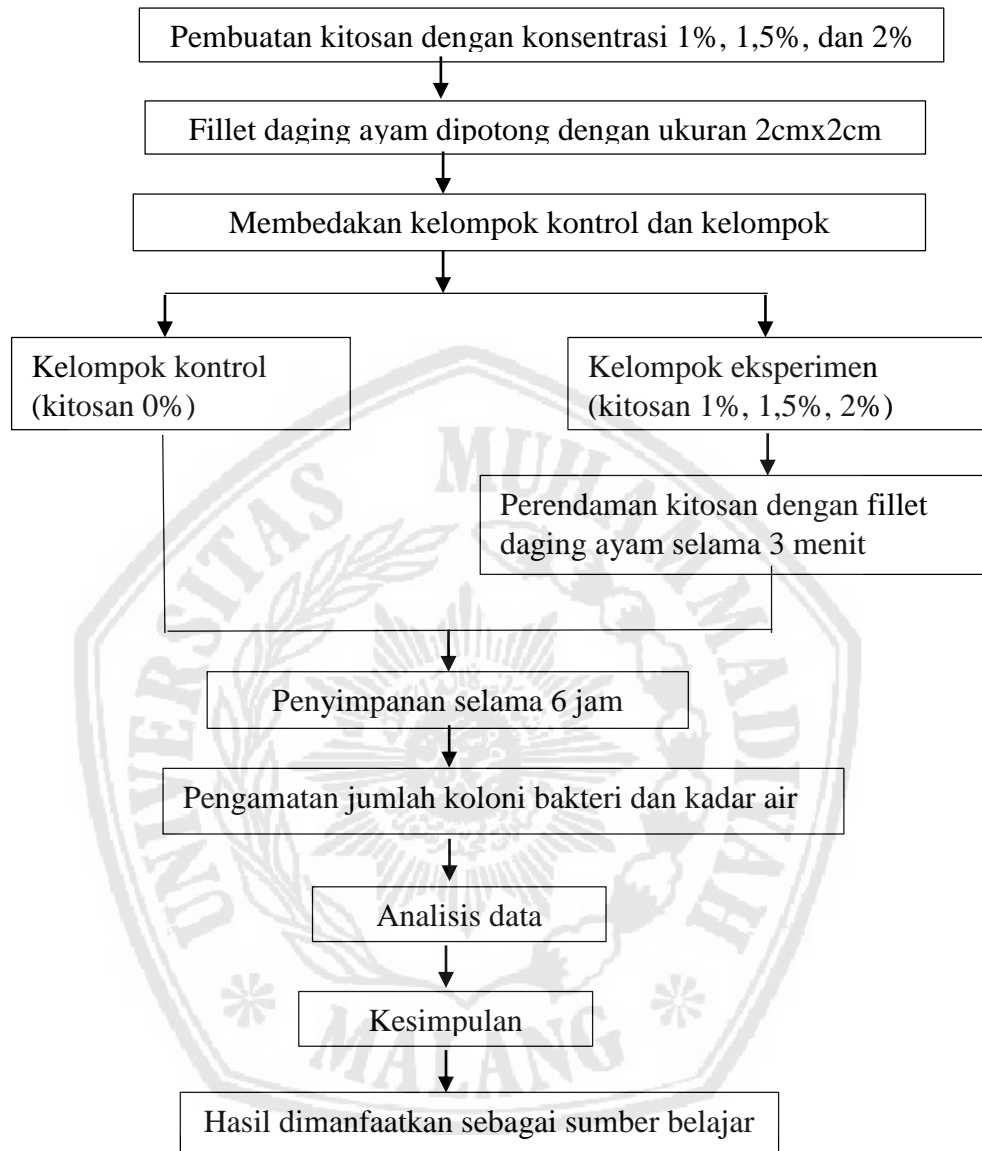
Keterangan:

B: berat sampel awal (gram)

B1: berat (sampel+cawan) sebelum dikeringkan

B2: berat (sampel+cawan) sesudah dikeringkan

3.5.3.2 Alur Penelitian



Gambar 3.4 Bagan Alur Penelitian

3.6 Metode Pengumpulan Data

3.6.1 Teknik Pengumpulan Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu melalui uji laboratorium. Data tentang analisa jumlah koloni bakteri atau TPC menggunakan metode tuang atau

penuangan untuk menghitung jumlah koloni per gram sampel dan kadar air menggunakan metode oven untuk menghitung kadar air per dua gram sampel. Perhitungan jumlah koloni bakteri menggunakan alat *coloni counter*, sedangkan perhitungan kadar air menggunakan rumus yang telah ditentukan.

3.6.2 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah instrumen pengamatan jumlah koloni bakteri pada fillet daging ayam dan kadar air daging ayam.

Tabel 3.1 Pengamatan jumlah koloni bakteri dan kadar air

Perlakuan	Jumlah Koloni Bakteri dan Kadar Air Penyimpanan 6 jam						Jumlah	Rata-rata
	Ulangan							
	1	2	3	4	5	6		
K0								
K1								
K2								
K3								
Jumlah								

3.7 Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data jumlah koloni bakteri dan kadar air fillet daging ayam. Data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan ANOVA satu jalur (*One Way Anova*) dengan tingkat ketelitian 0,05 untuk mengetahui adanya pengaruh konsentrasi kitosan cangkang udang vaname terhadap jumlah koloni bakteri dan kadar air fillet daging ayam. Setelah hasil dinyatakan signifikan dengan hasil uji mempunyai nilai lebih besar dari 0,05 maka dilanjutkan uji Duncan untuk mencari perlakuan terbaik dalam menghambat jumlah koloni bakteri dan

menurunkan kadar air. Sebelum data dilakukan uji hipotesis, maka data diuji terlebih dahulu dengan *Kolmogorof-Smirnov* dan *Levene Test* untuk mengetahui kenormalan dan kehomogenan data. Apabila data didapat tidak berdistribusi normal dan tidak homogen, maka dilakukan uji statistik non parametrik dengan uji Kruskal-Wallis. Uji Kruskal-Wallis merupakan sebagai alternatif apabila uji ANOVA satu jalur (*One Way Anova*) tidak dapat dilakukan karena data tidak berdistribusi normal.

